Versuche zur Entwicklung eines Modells für die klinikorientierte Grundlagenforschung an metastasierenden Mammacarcinomen mit Hilfe von drei menschlichen, xenotransplantierten Mammacarcinomen

Stefan Karl Thomas Wenzel

Diss. Frankfurt 9/89

1989

Aus dem
Zentrum der Frauenheilkunde und Geburtshilfe
des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
Abteilung für Gynäkologie und Onkologie
(Leiter:Prof.Dr.med.H.Schmidt-Matthiesen)

VERSUCHE ZUR ENTWICKLUNG EINES MODELLS FÜR DIE KLINIKORIENTIERTE GRUNDLAGENFORSCHUNG AN METASTASIERENDEN MAMMACARCINOMEN MIT HILFE VON DREI MENSCHLICHEN, XENOTRANSPLANTIERTEN MAMMACARCINOMEN

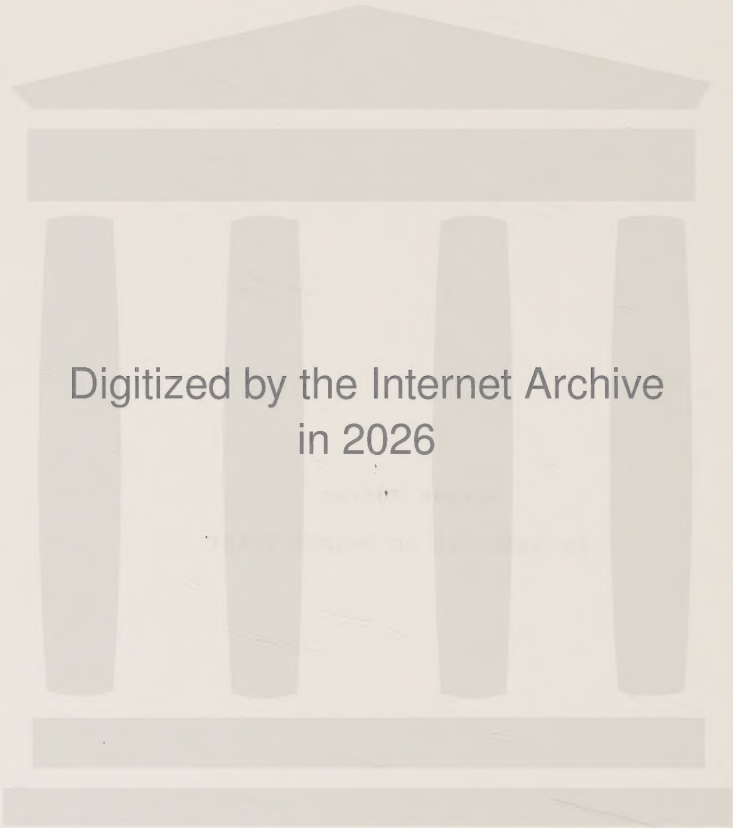
INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von
Stefan Karl Thomas Wenzel
aus Bremerhaven

Frankfurt am Main 1984

Meiner Mutter

im Andenken an meinen Vater


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523703_0016

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Materialien und Methoden	3
2.1. Beschreibung der Nacktmäuse (nu/nu-mice)	3
2.2. Zucht und Haltungsbedingungen der Nacktmäuse	3
2.2.1. Zucht	
2.2.2. Haltungsbedingungen	
2.3. Transplantationsmaterial	6
2.3.1. Tumor S.	
2.3.2. Tumor B.	
2.3.3. Tumor W.	
2.4. Gewinnung des Transplantationsmaterials	6
2.5. Immunsuppressive Vorbehandlung der Nacktmäuse	7
2.5.1. Kollektiv 1	
2.5.2. Kollektiv 2	
2.5.3. Kollektiv 3	
2.5.4. Kollektiv 4	
2.5.5. Kollektiv 5	
2.6. Transplantation der Tumoren	1o
2.6.1. Transplantationsort	
2.6.2. Operationstechnik	
2.6.3. Vorbereiten der Tiere zur Transplantation	
2.6.4. Narkoseverfahren	
2.6.5. Alter der Tiere zum Zeitpunkt der Transplantation	
2.7. Asservation der Organe und Tumoren und Anfertigung der mikroskopischen Präparate	12
2.8. Färbung der Präparate und lichtmikroskopische Auswertung	15

Seite

3. Ergebnisse 17

3.1. Überblick 17

3.2. Die Ergebnisse im einzelnen 18

3.2.1. Tumor S.

3.2.2. Tumor B.

3.2.3. Tumor W.

3.2.4. Regionäre Lymphknoten

3.2.5. Lungen

3.2.6. Lebern

3.2.7. Thorakale Wirbelsäulensegmente

4. Diskussion und Bewertung der Ergebnisse 22

4.1. Xenotransplantation im Vergleich zu den Verfahren der Zellkultur und der allogenetischen Transplantation 22

4.2. NK - Zellen und Makrophagen - Inhibitoren des invasiven Wachstums xenotransplantierter Tumoren 27

4.2.1. Darlegung der Forschungsergebnisse und Ansatzpunkte für die Forschung

4.2.2. Alternative Möglichkeiten zur Erzielung invasiven Wachstums und von Metastasierung

4.3. Perspektiven 32

5. Zusammenfassung 33

6. Literaturverzeichnis 34

7. Anhang 46

Tabellarische Darstellung der Versuchsreihen, geordnet nach den fünf Kollektiven

1. Versuchsreihe mit Tumor S. 47

2. Versuchsreihe mit Tumor B. 52

3. Versuchsreihe mit Tumor W. 57

8. Curriculum vitae 62

9. Dank 63

1o. Ehrenwörtliche Erklärung 64

1. Einleitung und Problemstellung

Das Mammacarcinom stellt mit ca. 23 % aller Krebserkrankungen bei der Frau die häufigste Lokalisation maligner Tumoren dar; die Altersverteilung streut zwischen dem 4o. und dem 75. Lebensjahr mit einem Altersgipfel um das 65. Lebensjahr, wobei zunehmend Patientinnen in der Prämenopause befallen werden. Die durchschnittliche Lebensdauer unbehandelter Fälle beträgt 3 1/2 Jahre.

Zur Krankenhausaufnahme erscheinen 6o bis 7o % aller Patientinnen erst, wenn bereits die Achsellymphknoten befallen sind. Da axilläre Metastasen des Mammacarcinoms die Überlebensrate auf ungefähr die Hälfte senken, ist die Prognose der Erkrankung ganz wesentlich abhängig vom Befallensein der axillären Lymphknoten (alle Zahlenangaben nach KEPP und STAEMMLER).

Nach BASTERT (1982) litt das Konzept der Primärtherapie des Mammacarcinoms bis ca. 196o darunter, daß einer hämatogenen Frühmetastasierung als einem den weiteren Krankheitsverlauf vorbestimmenden Faktor weit weniger Bedeutung beigemessen wurde als einer kontinuierlichen lymphogenen Ausbreitung.

Eine Auswertung der Mammacarcinomfälle der Frankfurter Universitäts-Frauenklinik der letzten Jahre zeigt, daß zur Zeit noch die meisten Mammacarcinome erst im Stadium T_2, i.e. bei einem Durchmesser von 2 bis 5 cm, diagnostiziert werden; in diesem Stadium ist davon auszugehen, daß die Mammacarcinome zum Zeitpunkt der Erstdiagnose durch operative und strahlentherapeutische Maßnahmen nicht mehr ausheilbar sind.

Dies wird von BASTERT der bereits stattgehabten hämatogenen Mikrometastasierung zugesprochen, was die Bedeutung des Mammacarcinoms als eine zu diesem Zeitpunkt schon systemische Erkrankung unterstreicht.

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, anhand von Tierversuchen mit immunsuppressiv vorbehandelten athymen Nacktmäusen, denen eine angeborene, nur schwach antigenwirksame zelluläre Immunabwehr zugesprochen wird, durch Xenotransplantation menschlicher Mammacarcinome ein Modell zu entwickeln, mit dem es möglich sein sollte, klinikorientierte Grundlagenforschung an metastasierenden Mammacarcinomen zu betreiben.

2. Materialien und Methoden

2.1. Beschreibung der Nacktmäuse (nu/nu-mice)

Diese besondere Mutante des Mäusestammes wurde erstmals 1962 von ISAACSON und CATTANACH erwähnt und von FLANAGAN 1966 eingehend beschrieben.

Die bei diesen Tieren vorhandene Thymusaplasie wurde 1968 von PANTELOURIS festgestellt.
Der genetische Defekt dieser Mäuse bedingt die Haarlosigkeit und ein weitgehendes Fehlen der T-Lymphocyten, was eine überaus mangelhafte spezifisch antigenreaktive zelluläre Immunabwehr zur Folge hat.

Nu/nu-Mäuse sind von Geburt an nackt und unterscheiden sich hierin wesentlich von allen bisher bekannten haarlosen Mutanten, die mit dem vollen Haarkleid geboren werden und erst nach oder mit dem ersten Haarwechsel ihr Haarkleid verlieren. FLANAGAN bezeichnet die Mäuse, die von Geburt an nackt und thymusaplastisch sind - Eigenschaften, die in autosomal-rezessiver Erbfolge weitergegeben werden - als " nude " und führt hierfür das Symbol " nu " ein.
Aufgrund ihrer angeborenen Thymusaplasie eignen sich die Nacktmäuse sowohl zur Erforschung der spezifischen Thymusfunktionen als auch zu Untersuchungen heterolog transplantierter Tumoren.

2.2. Zucht und Haltungsbedingungen der Nacktmäuse

2.2.1. Zucht

Die beiden hervorragenden, dominierenden Eigenschaften der

Nacktmaus, die Nacktheit und die Thymusaplasie, werden von nur einem Allel bestimmt. Sie werden entsprechend den Mendel'schen Vererbungsgesetzen weitergegeben und treten nur bei den homocygoten Merkmalsträgern in Erscheinung (i.e. rezessiver Erbgang).

In der hauseigenen Kolonie (NMRi/nu/nu), der unsere 225 Versuchstiere entnommen wurden, werden jeweils drei heterocygote Weibchen mit einem homocygoten Bock in einem Käfig gehalten. Nur die homocygote Nachkommenschaft wird den Muttertieren zur Aufzucht belassen.
Am 15. bis 16. Tag post partum werden die Jungtiere von den Müttern getrennt, entwickeln sich dann meist gut und haben im Alter von 5 Wochen ein Gewicht von ca. 2o bis 25 Gramm erreicht. Sie eignen sich nun für die Transplantation.
FOGH et al., 1982, beschreiben die Verwendung von Nacktmäusen zur Transplantation ab einem Alter von 6 bis 8 Wochen.

2.2.2. Haltungsbedingungen

In der Tierversuchsanlage der Frankfurter Universitäts-Klinik werden die Nacktmäuse - durch die baulichen Gegebenheiten bedingt - in einem offenen System ohne Barrieren gehalten.
Die Käfige der Tiere stehen in laminar-air-flow - Regalen (ALTROMIN^{R}), teilweise in Isolatoren.
Da die Tiere aufgrund der Haarlosigkeit einen größeren Flüssigkeits- und Wärmeverlust haben als behaarte Mäuse, ist eine Mindestluftfeuchtigkeit von 65 % und eine konstante Raumtemperatur von 28^{o} C erforderlich (FORTMEYER, 1981).

Die Versuchstiere werden in MAKROLON^{R}-Käfigen, Typ II, gehalten, die den Ansprüchen zur Haltung von Nacktmäusen - glatte Flächen als Voraussetzung für eine zufriedenstellende Reinigung, Autoklavenstabilität des Materials, möglichst

geringes Wärmeleitungsvermögen zur Vermeidung zusätzlicher Energieverluste der Tiere, weitgehende Freiheit von Zugerscheinungen - am nächsten kommt.

Bei der Belegung der Käfige wurden die einschlägigen Bestimmungen des Tierschutzes berücksichtigt, die der Maus bei der Gruppenhaltung einen Mindestflächenbedarf von 2 cm^2 pro Gramm Körpergewicht zugestehen. Als Einstreu in die Käfige dienten staubfreie Holzspäne (ALTROMIN^R). Durch die Verwendung staubfreier Einstreu konnte die Zahl retrobulbär auftretender Abszesse gering gehalten werden (FORTMEYER und BASTERT, 1981).
Die Beleuchtung stellt einen wirksamen Zeitgeber für circadiane Rhythmen dar. Um einen gleichmäßigen, das Versuchstier nicht zusätzlich belastenden Tagesablauf zu gewährleisten, bedarf es einer rhythmischen Steuerung von Hell und Dunkel. Es wurde bei unseren Versuchen darauf geachtet, daß die Hellphase nicht länger als 12 Stunden dauerte und während dieser Zeit die Lichtintensität in den Käfigen nicht höher war als 6o Lux.

Ernährt wurden die Tiere mit der Nacktmausdiät ALTROMIN 1414^R. Diese peletierte Diät wurde den Tieren ad libitum gereicht.
Der Flüssigkeitsbedarf der homocygoten Mäuse liegt um 2/3 über dem heterocygoter Mäuse (RYGAARD und FRIIS, 1974). Das für diese Tiere bestimmte Trinkwasser wurde durch Zugabe von 1-N HCl auf einen pH-Wert von 2,5 gebracht, um ein Wachstum des Keimes Pyocyaneus zu verhindern. Neben Kaliumsorbat wurde dem Trinkwasser noch alternierend Oxytetracyclin (CELASIN^R), Cephalexin (ORACEF^R) oder Ampicillin/Oxacillin (TOTOCILLIN^R) zugesetzt, um bei den Versuchstieren eine Antibiotikaprophylaxe zu betreiben.

2.3. Transplantationsmaterial

Bei den auf die Versuchstiere transplantierten Mammacarcinomen handelt es sich um Tumoren, von denen einer von einer prämenopausalen Patientin und zwei von Patientinnen in der Postmenopause stammten:

2.3.1. Tumor S.

Donator: eine Patientin in der Prämenopause (geb.194o)
Histologie: medulläres, stark entdifferenziertes polymorphzelliges Carcinom

2.3.2. Tumor B.

Donator: eine Patientin in der Postmenopause (geb.192o)
Histologie: teils solide, teils adenoid wachsendes Carcinom

2.3.3. Tumor W.

Donator: eine Patientin in der Postmenopause (geb.19o5)
Histologie: Carcinoma solidum

Alle drei oben aufgeführten Mammacarcinome stammen aus dem Krankengut des Zentrums der Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Klinikums der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt am Main.

2.4. Gewinnung des Transplantationsmaterials

Die Mammacarcinome wurden noch intra operationem nach der Exstirpation zerschnitten und in ein carbogenbegastes Medium (TCM = tissue culture medium 199, DIFCO) von 21° C

gegeben (s.BASTERT et al., 1981; KIM et al., 1982). Innerhalb von dreißig Minuten wurden dann Tumorstücke auf Nacktmäuse transplantiert.

Die von uns transplantierten Tumoren durchliefen vor Versuchsbeginn bereits mehrere Tierpassagen, und zwar:

Tumor S.	35 Tierpassagen
Tumor B.	18 Tierpassagen
Tumor W.	14 Tierpassagen

2.5. Immunsuppressive Vorbehandlung der Nacktmäuse

Die o.g. 225 Versuchstiere wurden aufgeteilt in drei Gruppen von je 75 Tieren, denen jeweils eines der drei genannten Mammacarcinome transplantiert werden sollte. Jede dieser drei Gruppen erfuhr eine weitere Unterteilung in fünf Kollektive von je 15 Tieren zum Zwecke verschiedener nachfolgend aufgeführter Vorbehandlungsmaßnahmen.

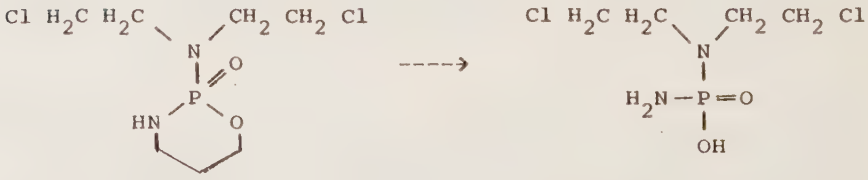
2.5.1. Kollektiv 1

Dieses Kollektiv wurde 14 Tage prae transplantationem in der strahlentherapeutischen Abteilung der Frankfurter Universitäts-Frauenklinik ganzkörperbestrahlt mit einer Strahlendosis von 7oo rad (s. MILLER, 1963). STEEL, COURTENAY und ROSTOM, 1978, beschreiben bei 2 Wochen zuvor thymektomierten Mäusen die Anwendung einer Strahlendosis von 9oo rad, SIMON et al., 1982, die Anwendung einer Strahlendosis von 5oo rad 1o Tage prae transplantationem. Die von uns zur Beschickung der Tiere gewählte Strahlendosis wurde von ausnahmslos allen Tieren gut toleriert.

2.5.2. Kollektiv 2

Den Tieren dieses Kollektivs wurde vier Tage prae transplantationem intraperitoneal Cyclophosphamid (ENDOXAN^{R}) injiziert, und zwar eine mit isotonischer NaCl-Lösung angesetzte Verdünnung, die, ausgehend von einem durchschnittlichen Körpergewicht von 25 Gramm pro Maus, 4o % der experimentell ermittelten LD_{5o} des Cyclophosphamids von 487 mg/kg KG_{Maus} (BASTERT, 1974, s.BASTERT et al., 1981) beträgt - also ca. 2oo mg/kg KG_{Maus}. Dies entspricht einer Gabe von 5 mg Cyclophosphamid pro Tier.

Cyclophosphamid ist ein DNA-wirksamer Tumorhemmstoff (Zytostatikum) aus der Gruppe der alkylierenden Substanzen. Es ist eine in vitro inaktive Verbindung, die erst in vivo durch mikrosomale Enzyme in der Leber in seine aktive Wirkform übergeführt wird.Unter Abspaltung von Acrolein entsteht die reaktionsfähige Form des Cyclophosphamids mit stark cytotoxischen Eigenschaften (BROCK und HOHORST,1966; WELLHÖNER, 1975):



Cyclophosphamid

N,N-Bis(2-chloräthyl)-phosphorsäurediamid

Die reaktionsfähige Form des Cyclophosphamids ist in der Lage, nucleophile Zentren biologischer Systeme unter physiologischen Bedingungen zu alkylieren. Da die DNA viele alkylierbare Zentren besitzt, wird durch Veränderungen auch die RNA-Synthese und damit die Proteinproduktion beeinflußt.
Das Cyclophosphamid stellt eine der am stärksten immunsuppressiv wirksamen Substanzen dar, wenn es vor Transplantation antigenetisch wirksamer Xenotransplantate verabreicht wird (HERSCH, 1973).

2.5.3. Kollektiv 3

Das in 2.5.2. angeführte Procedere fand hier Anwendung in der Gabe der halbierten Dosis von 2o % der LD_{5o} von Cyclophosphamid, i.e. in der Verabreichung von 2,5 mg ENDOXAN^{R} pro Maus intraperitoneal vier Tage prae transplantationem.

2.5.4. Kollektiv 4

Für dieses Kollektiv wurde die Kombination der in 2.5.3. beschriebenen Gabe von 2o % der LD_{5o} von Cyclophosphamid mit einer 24 Stunden vor der Transplantation angewandten i.p.Injektion von steriler Federtusche (" indian ink ") gewählt.

Der Federtusche, die in einer Menge von o,1 ml pro Tier gegeben wurde, wird in der Literatur die Wirkung zugesprochen, aus dem Peritoneum zellulär abwehrwirksame Makrophagen und Lymphocyten eliminieren zu können (TORHORST und RICHNER, 1981).

2.5.5. Kollektiv 5

Diesem Kollektiv wurde monotherapeutisch o,1 ml sterile Federtusche (" indian ink ") 24 Stunden prae transplantationem i.p. appliziert.

Es ergaben sich somit fünf Vergleichskollektive von Nacktmäusen, die nun während des Wachstumszeitraumes der transplantierten humanen Mammacarcinome und nach Versuchsabschluß spezifische Unterschiede betreffs Wirksamkeit der jeweils angewandten Immunsuppression (Tumorproliferation, Invasion und Disseminierungstendenz) erwarten ließen.

2.6. Transplantation der Tumoren

2.6.1.Transplantationsort

Bei den Versuchen wurde das paramamilläre Fettgewebe der vorderen Milchleiste als Transplantationsort für die zu verpflanzenden Mammacarcinome gewählt. Diese Methode wird in der gängigen Literatur neben zahlreichen alternativen Verfahren beschrieben (GIOVANELLA et al., 1976 und 1978; BASTERT et al., 1981). In dieser Region ist, da das Milchdrüsengewebe über eine gute Vaskularisation verfügt, schon innerhalb weniger Tage mit der Einsprossung von Gefäßen und dem Anwachsen des Transplantates zu rechnen. Außerdem bietet sich dieser Transplantationsort an, da hier - auch bei starker Größenzunahme des Tumors - weder Druck auf noch Verdrängung essentieller Strukturen der Maus zu beobachten sind.

2.6.2. Operationstechnik

Zur subcutanen Transplantation des zuvor auf ca. 2 mm^3 kleingeschnittenen Tumormaterials, das unmittelbar einem Versuchstier (Träger) entnommen worden war, wurde die Haut mit einem kleinen Scherenschlag eröffnet und durch Unterminieren der Haut eine Tasche für das Transplantationsmaterial geschaffen. Nach Einbringen des Transplantates wurde der Hautschnitt mit einer Michel-Klemme verschlossen, die nach Ablauf von 4 Tagen wieder entfernt wurde, um die Entstehung von Hautnekrosen zu vermeiden. Die Wundheilung gestaltete sich komplikationslos per primam intentionem.

2.6.3. Vorbereiten der Tiere zur Transplantation

Bei unseren Versuchen wurde das östrogenrezeptorpositive Mammacarcinom, das der prämenopausalen Patientin entstammte, auf fertile weibliche Nacktmäuse verpflanzt.
Die beiden Mammacarcinome der postmenopausalen Donatoren wurden hingegen auf sieben Tage zuvor kastrierte männliche Tiere transplantiert.
Die Kastration der männlichen Nacktmäuse erfolgte bei gedecktem Samenstrang. Beide Hoden wurden hierbei nach einem kleinen Querschnitt im oberen Scrotum mit einem Seidenfaden ligiert und abgetragen. Die Wundversorgung erfolgte auf die gleiche Weise wie bei der Tumortransplantation.
Die Nacktmäuse waren zum Zeitpunkt der Kastration zwischen 4 und 5 Wochen alt. Sieben Tiere der letzten Versuchsreihe (Tumor W.) starben infolge Nahtinsuffizienz an Darmprolaps.

2.6.4. Narkoseverfahren

Sämtliche Operationen wurden in Ätherallgemeinnarkose durchgeführt. Das Verfahren wurde von den Tieren gut toleriert; bei vier Tieren stellte sich jedoch durch Überdosierung während der Transplantation Atemstillstand ein.

2.6.5. Alter der Tiere zum Zeitpunkt der Transplantation

Die Nacktmäuse waren zum Transplantationstermin zwischen 5 und 6 Wochen alt. Es wurde darauf geachtet, daß die Tiere, die innerhalb einer Versuchsreihe in den einzelnen Kollektiven beobachtet werden sollten, möglichst gleichaltrig waren. Die Vermutung, daß die Angehrate und Wachstumsgeschwindigkeit der Tumoren mit dem Alter der Tiere zum Zeitpunkt der Operation in Verbindung zu bringen sind, wurde in unserem Labor durch BADER et al., 1981, verifiziert.

2.7. Asservation der Organe und Tumoren und Anfertigung der mikroskopischen Präparate

Nach einer Beobachtungsphase von 6 (Tumoren S. und W.) bzw. 1o Wochen (Tumor B.) - diese Zeiten legen sich fest durch unterschiedliche Proliferations- bzw. Wachstumsgeschwindigkeiten der Carcinome, stellen letztendlich die geeignete Zeitspanne für eine sachgerechte Entnahme und Weiterverarbeitung des Transplantationsmaterials dar und ließen gleichzeitig eine erfolgte Metastasierung erwartenwurden die Nacktmäuse durch Genickbruch getötet und die Tumoren, ferner die Organe den Mäusen entnommen.

Dies geschah durch akkurates Herauslösen einerseits der vom makroskopischen Eindruck her abgekapselt gewachsenen Tumoren -

andererseits der später auf Metastasen zu untersuchenden Organe, die wie folgt aufgeführt sind:

I regionäre Lymphknoten der vorderen Milchleiste
II Lungen
III Lebern
IV thorakale Segmente der Wirbelsäulen

Alle entnommenen Asservate wurden in Glasröhrchen mit Bouin´scher Fixationslösung mit Eisessig im Verhältnis 1o:1 verbracht.
Die auf diese Weise gewonnenen Untersuchungsobjekte wurden anschließend in - entsprechend den vorgegebenen Versuchstiernummern bezifferte - Fixationsformen für die nachfolgende Einbettung in Paraffin verwahrt. Die Fixationsformen wurden bis zur Einbettung in einer 1o % igen Formaldehydlösung gegen ein Austrocknen geschützt.

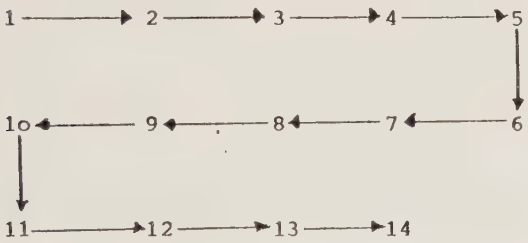
Ausgenommen vom eben genannten Ablauf waren zunächst die Wirbelsäulenasservate, die zwischenzeitlich in konzentrierter Essigsäure entkalkt wurden und danach dem gleichen Verfahren wie die anderen Präparate unterzogen wurden.
Die Durchtränkung der Asservate fand während der Nachtstunden in einem uns vom Histologischen Labor der Universitäts-Frauenklinik freundlicherweise zur Verfügung gestellten Großgerät (AUTOTECHNIKON) statt und beinhaltete eine mehrstufige Verfahrensweise, die den Asservaten eine aufwendige Fixation zuteil werden ließ. Die Formen durchliefen dabei zwölf Fixationsbäder:

1.	Formalin	Dauer: 2-3 Stunden
2.	Äthylalkohol, 7o %ig	Dauer: 1 1/2 "
3.	Äthylalkohol, 95 %ig	Dauer: 1 1/2 "
4.	Äthylalkohol, 95 %ig	Dauer: 1 1/2 "
5.	Äthylalkohol, 1oo %ig	Dauer: 1 1/2 "
6.	Äthylalkohol, 1oo %ig	Dauer: 2 "
7.	Äthylalkohol, 1oo %ig	Dauer: 1 Stunde
8.	Benzoesäuremethylester	Dauer: 1 1/2 Std.
9.	Benzoesäuremethylester	Dauer: 2 Stunden
1o.	Xylol	Dauer: 2 "
11.	Paraffin	Dauer: 1/2 Stunde
12.	Paraffin	Dauer: 1 "

Nach Ablauf der Durchtränkung erfolgte die Einbettung in heißes Paraffin. Mit Erstarren des Paraffins wurden die Fixationsformen abgelöst und schließlich die freiliegenden Fertigpräparate mit einem Präzisionsmikrotom in zwischen 3 und 5 µm dicke Schichten geschnitten.
Die Schnitte wurden durch Aufschwimmenlassen im Wasserbad geglättet, auf Objektträger mit analoger Bezifferung gebracht und zur Auslösung des Paraffins bei 5o° C für jeweils 15 Minuten inkubiert. Danach erfolgte die Einfärbung wie unten beschrieben.

2.8. Färbung der Präparate und lichtmikroskopische Auswertung

Die Färbemethode unserer Wahl war die Färbung mit Hämatoxylin und Eosin nach dem unten aufgeführten Schema:



1.	Xylol	Dauer: 5 Minuten
2.	Xylol	Dauer: 5 Minuten
3.	Äthylalkohol, 7o %ig	Dauer: 5 Minuten
4.	Äthylalkohol, 95 %ig	Dauer: 5 Minuten
5.	Äthylalkohol, 1oo %ig	Dauer: 5 Minuten
6.	Aqua bidest.	Dauer: 1o Minuten
7.	Hämatoxylin	Dauer: 1o Minuten
8.	Wasser, fließend	Dauer: 1o Minuten
9.	Eosin	Dauer: 5 Sekunden
1o.	Äthylalkohol, 1oo %ig	Dauer: 5 Minuten
11.	Äthylalkohol, 95 %ig	Dauer: 5 Minuten
12.	Äthylalkohol, 7o %ig	Dauer: 5 Minuten
13.	Xylol	Dauer: 5 Minuten
14.	Xylol	Dauer: 5 Minuten

Dieser Färbemethode kommt bei der Betrachtung histologischer Schnittpräparate mit Wertlegung auf die Darstellung von tumorspezifischen Verschiebungen der Kern-Plasma-Relation die Eigenschaft einer Kontrastfärbung zu, da sie sehr deutlich Zellkerne blau und das Cytoplasma blaßrot darzustellen vermag (LEONHARDT, 1974).

Der Färbung schloß sich die sofortige Abdeckung mit geschliffenen Deckgläsern und Reinigung der Objektträger an.

Letzter Schritt der Vorgehensweise war die mikroskopische Betrachtung der gefärbten Schnitte mit einem Lichtmikroskop (ZEISS) in den Vergrößerungen 1o x und 4o x (Okular 2 x), über deren Erkenntnisse in Punkt 3. berichtet wird.

3. Ergebnisse

3.1. Überblick

Bis zur Erstellung auswertbarer mikroskopischer Schnittpräparate vergingen in etwa - je nach Proliferationsgeschwindigkeit der drei zur Transplantation verwendeten Tumoren - zwischen 18 und 22 Wochen; hierbei ist zu berücksichtigen, daß sich die Aufzucht der Tiere aufgrund der notwendigen Sorgfalt schwierig gestaltet und durch die Empfindlichkeit der Nacktmäuse die Zahl der zur Verfügung stehenden Tiere durch bakteriell bedingte Pneumonien reduziert wurde, aber auch durch die Vielzahl der Versuchsreihen erhebliche Wartezeiten entstanden.

Um so bedauerlicher war es, daß nach Komplettierung der Versuchstierkollektive eine erhebliche Zahl von Nacktmäusen unter den Versuchen durch den Hospitalismuskeim Pseudomonas aeruginosa an letal verlaufenden Pneumonien zugrunde ging. Hierbei war deutlich eine Wanderung der Infektion innerhalb der in den laminar-air-flow- Regalen angeordneten Käfigreihen sichtbar.

Diese Infektion betraf die zeitlich parallel laufenden Versuche mit denjenigen Nacktmäusen, auf die die Tumoren S. und B. transplantiert worden waren. Die Tiere der Transplantationsversuche mit Tumor W. blieben verschont, da diese später durchgeführt wurden und hier eine verstärkte Antibiotikaprophylaxe mit Cefotaxim (CLAFORAN^{R}) betrieben wurde.

Tiere, die zur Aufzucht in benachbarten Regalen untergebracht waren und anderen Versuchsreihen zufließen sollten, wurden in gleich schwerem Maße betroffen, so daß eine

große Zahl aller Tiere in dem für die Haltung der Nacktmäuse bestimmten Raum in der Tierversuchsanlage der Frankfurter Universitäts-Klinik neu aufgezogen werden mußte.

Die Gesamtverluste an unseren Tieren belaufen sich auf 5o Nacktmäuse:

1. Mäuse der Versuchsreihe mit Tumor S.: Exitus letalis bei 16 Tieren (21,3 % der Versuchsreihe) wegen Pneumonie.
2. Mäuse der Versuchsreihe mit Tumor B.: Exitus letalis bei 23 Tieren (3o,7 % der Versuchsreihe) wegen Pneumonie.
3. Anderweitige Verluste : 11 Tiere, davon 7 wegen Darmprolaps und 4 wegen nicht tolerierter Ätherallgemeinnarkose (s. 2.6.3. und 2.6.4.).

3.2. Die Ergebnisse im einzelnen

3.2.1. Tumor S.

I.Makroskopisches Bild:

a) in vivo - abgekapseltes Wachstum, keine sichtbare Infiltration in das umliegende Gewebe

b) nach Exstirpation - glatte Oberfläche, überhäutet. Durchblutung nicht wesentlich erhöht. Nur in wenigen Fällen zentrale Nekrosen erkennbar

II.Histologie:

entsprechend den Angaben in 2.3.1.; starke Entdifferenzierung der Epithelverbände. Multiple, überwiegend pathologische Mitoseformen. Polymorphie der Zellkerne mit deutlicher Verschiebung der Kern-Plasma-Relation. Glatte Abgrenzung zum umliegenden Wirtsgewebe. Keine sichtbaren Infiltrationen.

Ergebnis: Tumor S. entspricht makro- und mikroskopisch dem Ausgangsgewebe.

3.2.2. Tumor B.

I. Makroskopisches Bild:

a) in vivo - stark zerfallene Tumormassen mit destrukturiertem Oberflächenbild, von Kapsel umgeben.

b) nach Exstirpation - weiterer Zerfall des Tumors; viele sichtbare Einblutungen. Vorherrschend sind schleimige Nekrosen im Inneren des Tumors.

II. Histologie:

entsprechend den Angaben in 2.3.2.; medullär wachsende Zellnester und Stränge atypisch proliferierter, polymorpher, hyperchromatischer Epithelzellen mit zahlreichen Einblutungen und zentralen Nekrosen.

Ergebnis: Tumor B. entspricht makro- und mikroskopisch dem Ausgangsgewebe.

3.2.3. Tumor W.

I. Makroskopisches Bild:

a) in vivo - abgekapseltes Wachstum, keine sichtbaren Infiltrationen in das umliegende Gewebe.

b) nach Exstirpation - glatte Oberfläche, feste Konsistenz. Nekrosen im Inneren nicht erkennbar.

II. Histologie:

entsprechend den Angaben in 2.3.3.; solides Carcinom. Hyperchromatische, zum Teil bizarr geformte Zellkerne. Cytoplasmareiche, vacuolisierte Tumorzellen. Multiple, überwiegend pathologische Mitoseformen. Keine sichtbaren Infiltrationen.

Ergebnis: Tumor W. entspricht makro- und mikroskopisch dem Ausgangsgewebe.

3.2.4. Regionäre Lymphknoten

I. Makroskopisches Bild:
Sichtbare Vergrößerungen der regionären Lymphknoten der vorderen Milchleiste waren in einigen Fällen, die sich ausschließlich auf die Nacktmäuse der Transplantationsreihe mit Tumor W. beschränkten, sichtbar. Bei zahlreichen Tieren waren regionäre Lymphknoten nicht auffindbar.

Lymphknoten mit glatter Oberfläche, bohnenförmiges Aussehen. Gute Isolierbarkeit.

II. Histologie:
In allen Fällen, auch bei den vergrößerten Lymphknoten, typische Verhältnisse. Lymphatisches Gewebe allseits von Bindegewebskapsel umgeben. Radiär verlaufende Sinus (Intermediärsinus) führen aus den Randsinus in zentral gelegene Marksinus. In den Sinus Lymphocyten, Monocyten, Makrophagen sichtbar. Zwischen den Sinus retikuläres Bindegewebe.

3.2.5. Lungen

I. Makroskopisches Bild:
Lungenlappen von bindegewebiger Grundmembran umhüllt; lockere Haftung der Pleura visceralis. Aus der Membran hiluswärts ziehende Bindegewebssepten. Glatte Organoberfläche; makroskopisch keine Metastasierungshinweise.

II. Histologie:
Bronchioli terminales mit sternförmigem Lumen (Flimmerepithel). Bronchioli alveolares mit vereinzelten Alveolen. Nach Aufteilung in die Ductus alveolares regelgerechtes Zusammenfassen der Alveolarmündungen, Enden in

den sacculi alveolares. Keine sichtbare Tumorinfiltration.

Ergebnis: normalgewebiges Bild in allen Präparaten.

3.2.6. Lebern

I. Makroskopisches Bild:
Zusammenhalt durch straffe capsula fibrosa (Glisson'sche Kapsel), am Schnitt im Abstand von 1-2 mm Zentralvenen. Glatte Organoberfläche.

II. Histologie:
a) Leberläppchen mit polygonal abgeflachter Oberfläche.
b) Periportalfelder mit Gefäßquerschnitten (Glisson'sche Trias), Zentral-und Schaltvenen.
c) Sinusoide Kapillaren: im Endothel Zellen mit Granula (Kupffer'sche Sternzellen). Hin und wieder retikulinfaserhaltige Disse'sche Räume sichtbar.
d) Leberepithelien: balkenartige Anordnung unter Einschluß von Gallenkapillaren.

Ergebnis: keine Hinweise auf Tumorinfiltration

3.2.7. Thorakale Wirbelsäulensegmente

I. Makroskopisches Bild:
Regelrechte Anordnung von Wirbelkörpern und Disci intervertebrales ohne Hinweis auf Tumorarrosion oder -infiltration.

II. Histologie:
Faserknorpel als Verbindung der Knochenteile; Kollagenfasern ins Periost einstrahlend; Disci intervertebrales mit einander spiralig überkreuzenden lamellären Kollagenstrukturen (" Fischgräten ").

Ergebnis: kein Hinweis auf Tumorinfiltration bei normalen Strukturen.

4. Diskussion und Bewertung der Ergebnisse

4.1. Xenotransplantation im Vergleich zu den Verfahren der Zellkultur und der allogenetischen Transplantation

Bis zum Ende der sechziger Jahre war es nicht möglich, menschliche Tumoren im Tierexperiment direkt und ohne zusätzliche immunsuppressive Maßnahmen zu untersuchen. Zu Testzwecken standen bis dahin lediglich zwei Modelle zur Verfügung: die Zellkultur und die Transplantation tierischer Tumoren.

Beim erstgenannten, zytologisch-morphologischen Verfahren wird Tumormaterial in Phosphatpufferlösung gewaschen, mechanisch zerkleinert und zur fermentativen Aufspaltung in Einzelzellen trypsiniert. Die Zellen werden auf ein geeignetes Nährmedium verpflanzt. Die Angehrate solcher Zellkuturen schwankt zwischen 1o und 85 %.
In vielen Primärkulturen wachsen neben Tumorzellen auch Bindegewebszellen an, so daß die in-vitro-Verhältnisse denen in vivo ähneln (LIMBURG und KRAHE, 1964).
Vorteilhaft ist, daß teilungsfähige Zellen über mehrere Zellzyklen hinweg beobachtet werden können; problematisch ist, daß nicht alle Zellen in der Gewebekultur gleichmässig anwachsen, so daß die Gefahr besteht, die Testung an möglicherweise bereits selektionierten Tumorzellpopulationen durchzuführen, die nicht mehr die Gesamtheit des Malignoms widerspiegeln. Auch wird die Proliferationsrate der Tumoren verändert. Die Tumorzelle ist in der Zellkultur in ihrem Wachstumsverhalten isoliert und kann nicht im

Zusammenhang mit dem Wirtsorganismus beobachtet werden (TANNENBERGER und BACIGALUPO, 197o; MATTHIAS, 1973; LIMBURG, 1978).

Um 189o wurden die ersten auf Versuchstiere transplantierten Tumoren experimentell erforscht. Heute sind mehr als 1oo maligne Tumoren zur Transplantation auf Versuchstiere im Gebrauch (SIGURA, 1965).
Diese Methode hat den Vorteil, daß die Tumoren im Wirtsorganismus wachsen und beobachtet werden können.
Die Tumoren sind circadianen Rhythmen und Schwankungen unterworfen und führen somit kein " Eigenleben ". Auch besteht hier nicht die Gefahr der Selektion nicht repräsentativer , eventuell sogar therapieresistenter bzw. besonders sensibler Zellverbände.
Nachteilig ist bei transplantierten Tiertumoren, daß sie zu einem überwiegenden Prozentsatz der bisher untersuchten Fälle eine erhebliche histologische Veränderung vollziehen (SIGURA, 1965), was ständige routinemäßige Kontrollen des histologischen Bildes nach sich zieht, insbesondere bei mehreren Tumorpassagen.

Das Idealbild des Tiermodells für die onkologisch experimentierenden Wissenschaftler sollte die oben aufgeführten Vorteile auf sich vereinigen sowie deren Nachteile nicht beinhalten. Es sollte

- transplantierte menschliche Carcinome ohne Abstoßungsreaktionen und ohne immunsuppressive Vorbehandlung annehmen
- beliebig oft passagiert werden können (zur Vermehrung vorhandenen menschlichen Tumormaterials)
- die histologischen Grundstrukturen der Tumoren bewahren,

alles in allem also zu

- reproduzierbaren Ergebnissen verhelfen.

Annähernd wurde diesem Idealbild die oben beschriebene Nacktmaus gerecht. Sie eignet sich vorzüglich zur tierexperimentellen Untersuchung heterotransplantierter Tumoren vom Menschen, da sich eine weitreichende Beibehaltung der im Ausgangstumor zu findenden spezifischen Strukturen nach der Transplantation auf der Nacktmaus erwies, sowohl den Zelltyp als auch den Tumoraufbau betreffend (POVLSEN und RYGAARD, 1971; POVLSEN, 1981; BASTERT, 1981).

Neben dem histologischen Bild spielen die Stoffwechseleigenschaften eines Tumors zur Beurteilung der Brauchbarkeit eines Tiermodells eine wesentliche Rolle. Man findet auch in diesem Punkt weitgehende Übereinstimmung zwischen den Transplantattumoren auf der Nacktmaus und dem Originaltumor (VISFELDT et al., 1972; POVLSEN et al., 1973; BASTERT, 1977; SHIN et al.,1977; IKEDA et al.,1978; GIOVANELLA und FOGH, 1978). Hier sind in erster Linie zu nennen der Gehalt an cAMP (HELSON et al., 1978), der CEA-RIA-Titer (SORDAT et al., 1974; MIWA et al., 1977) und das Rezeptorenmuster bei Mammacarcinomen (MICHEL et al., 1978). Das gleiche gilt auch für die Hormonproduktion endokrin aktiver Tumoren und das Pigmentmuster bei Melanomen (TAGUCHI et al., 1977; SHIN et al., 1977; KAMEYA et al., 1977; USADEL et al., 1978).

BASTERT zeigte 1980, daß mehrfach passagierte Tumoren mit dem vom Patienten entnommenen Tumormaterial in Histopathologie, Chromosomenanalyse, Wachstumsgeschwindigkeit und funktionellen Aktivitäten übereinstimmen. Transplantierte Tumoren auf Nacktmäusen tragen jedoch im Gegensatz zu den in in-vivo-Verhältnissen im menschlichen Organismus wachsenden Carcinomen entscheidend abweichende Merkmale - was sich auch in unseren Versuchen erwies.

Menschliche Mammacarcinome zeichnen sich vor vielen anderen malignen Tumoren dadurch aus, daß sie frühzeitig, in 6o-65 % aller in der Klinik diagnostizierten Primärfälle, hämatogen und lymphogen metastasieren. Diese Eigenschaft erklärt auch die Gefährlichkeit bzw. die ungünstige Prognose der meisten Mammacarcinome; werden doch rund 65 % aller Mammacarcinome durch die Primäroperation - auch durch supraradikale Eingriffe - nicht auf Dauer geheilt, sondern treten früher oder später in das Stadium der generalisierten Fernmetastasierung ein.

Leider ist es in der zurückliegenden Zeit nur in Einzelfällen gelungen, auf Nacktmäusen eine generalisierte Fernmetastasierung von transplantierten Mammacarcinomen nachzuweisen (SHARKEY et al., 1978). Für eine klinksnahe Grundlagenforschung wäre es aber von überragendem Interesse, ein Modell mit metastasierenden menschlichen Mammacarcinomen zu besitzen.
Obwohl von der onkologischen Arbeitsgruppe an der Universitäts-Frauenklinik in Frankfurt am Main bereits mehr als 65o menschliche Mammacarcinome auf nu/nu-Mäuse transplantiert wurden, haben wir in keinem Fall eine generalisierte Fernmetastasierung feststellen können. Ursprünglich invasiv, infiltrierend und metastasierend wachsende Carcinome wachsen auf der Nacktmaus bisher meist expansiv und sind von einer Stromkapsel umgeben (GIOVANELLA et al., 1972; TAGUCHI et al.,1977; BASTERT et al., 1981).

Ausgehend von Literaturhinweisen (s.4.2.1.),daß NK-Zellen der Nacktmaus (" natural-killer-cells ") das Auftreten einer Fernmetastasierung verhindern, haben wir nach Wegen gesucht, durch zusätzliche immunsuppressive Maßnahmen wie die Ganzkörperbestrahlung, die Gabe von Cyclophosphamid und makrophagenabsorbierender Federtusche intraperitoneal zu einem Metastasierungsmodell zu gelangen.

Modelle mit metastasierenden Tumoren auf Nacktmäusen werden in der Literatur meist nur unter Zuhilfenahme von etablierten Gewebekulturlinien einzelner Tumoren mitgeteilt.

KYRIAZIS et al., 1978, beschreiben anhand von Versuchen mit Tumoren aus Zellinien, daß sich hier deutliche Unterschiede bei verschiedenen Transplantationstechniken ergeben; so sind Tumoren, die intraperitoneal transplantiert wurden, in der Lage, invasiv in intraabdominale Organe einzuwachsen und sogar in die Lungen und die mediastinalen Lymphknoten zu metastasieren, wobei Tumornekrosen minimal blieben.
Subcutan transplantierte Tumoren hingegen zeigen komplette Einkapselung in einer Stromkapsel (erst bei Tieren, die nach einem halben Jahr noch lebten, konnten Metastasen in den regionären Lymphknoten nachgewiesen werden). Schon nach 1-2 Monaten war ein großer Teil der Tumoren nekrotisch.

Diese Beobachtungen decken sich mit unseren Versuchsergebnissen. Ursächlich für die Entstehung der Nekrosen ist wohl eine bei starker Vaskularisation der subcutan transplantierten Tumoren vorhandene hohe Durchblutungserfordernis, der das umliegende Wirtsgewebe trotz ebenfalls guter Vaskularisation nicht gerecht werden kann. Die hohe Durchblutung scheint zugleich einen wichtigen Faktor zur Prävention entfernt liegender Metastasierung darzustellen (KYRIAZIS et al., 1978).

Was die Bedeutung der Überwindung lokaler " Barrieren " für die Möglichkeit einer generalisierten Ausbreitung von Xenotransplantaten betrifft, siehe 4.2.

4.2. NK - Zellen und Makrophagen - Inhibitoren des invasiven Wachstums xenotransplantierter Tumoren

4.2.1. Darlegung der Forschungsergebnisse und Ansatzpunkte für die Forschung

Bei xenotransplantierten Tumoren, die nicht in-vitro-Zellinien entstammten, wird eine spontane Metastasierung in andere Organe höchst selten beobachtet (GIOVANELLA et al., 1973; SHARKEY et al., 1978) - dies auch bei ursprünglich stark metastasierenden Tumoren und Tumormetastasen, die zur Transplantation verwendet wurden.
Diese Tatsache scheint bedingt durch die Anwesenheit von " natural-killer-cells ", sogenannten NK-Zellen, die sich, bei Abwesenheit funktionaler Thymocyten, durch ausgeprägte cytotoxische Wirkung auszeichnen und besonders gegen Zellen mit starken Oberflächenantigenen gerichtet sind (HERBERMAN et al., 1979; MINATO et al., 1979).

Die NK-Zellen wurden erstmals von LOOR und ROELANTS (1974 und 1975) beschrieben. Sie sind vorwiegend in der Milz in großer Anzahl zu finden. Bei jungen Tieren ist die Zahl der NK-Zellen geringer als bei älteren Mäusen, so daß bei sehr jungen Tieren von SORDAT et al., 1977, und MACHADO et al., 1981, Transplantattumoren mit invasivem Wachstum und mit Metastasierungsneigung nachgewiesen werden konnten.

HERBERMAN und HOLDEN, 1978, haben die NK-Zellen als eine Subpopulation von Lymphocyten im Detail beschrieben.
WEST et al., 1977, zeigen als Ergebnis ihrer Studien, daß NK-Zellen zwar keine T-Lymphocyten zu sein scheinen, aber zelluläre Reaktionen wie die Anlagerung an Erythrocyten zeigen.

KAPLAN und CALLEWAERT, 1978, beschreiben eine Empfindlichkeit gegenüber spezifisch gegen menschliche T-Zellen gerichtetem Serum plus Komplement. Als Bestätigung der Zugehörigkeit zur T-Zell-Linie führten sie die deutliche Beseitigung cytotoxischer Aktivität der NK-Zellen durch spezifisches Anti-T-Zell-Serum plus Komplement an. Somit scheinen sich NK-Zellen nicht grundsätzlich von T-Lymphocyten zu unterscheiden. Nach LOOR und ROELANTS, 1974, stellen sie quasi Prä-T-Lymphocyten einer frühen Reifestufe innerhalb der T-Zell-Linie dar.

Zur Erzielung invasiven Wachstums scheint dem Anti-T-Zell-Serum daher grundsätzliche Bedeutung beizukommen, da es sich gegen die NK-Zellen und damit gegen die durch diese induzierte Cytotoxizität richtet.
Die ebenfalls bekannte Strahlensensibilität der NK-Zellen (SIMON et al., 1982) weist einen weiteren Weg für die Forschung. In unseren Versuchen zeigte sich, daß sich bei den strahlenbehandelten Kollektiven das Tumorwachstum weder lokoregionär an der Transplantationsstelle noch peripher im Sinne einer Metastasierung beeinflussen ließ.

Nach Untersuchungen von KIESSLING et al., 1977, und RICCARDI et al., 1978, scheinen NK-Zellen spezifisch die genetisch determinierten Histokompatibilitätsantigene sowohl von Knochenmarkslamellen als auch von Tumorzellen wiederzuerkennen und mit ihnen zu reagieren. Die Reagibilität der NK-Zellen erfolgt dabei in einer Frühphase nach Tumortransplantation (TORHORST und RICHNER, 1981; HANNA, 1982).

Werden im Tumorwachstum lokale " Barrieren " überschritten, d.h. wächst der Tumor im Wirtstier heran, wird die cytotoxische Aktivität der NK-Zellen interessanterweise gehemmt.

Dies läßt sich ableiten von Beobachtungen von HERBERMAN et al., 1975, und BECKER und KLEIN, 1977: Bei Mäusen mit Tumoren, deren Ausdehnung umfangreicher ist, als im Zusammenhang mit den Darlegungen zur cytotoxischen Aktivität der NK-Zellen dargelegt, ist trotz fehlender Infiltration das lokale Tumorwachstum nicht mehr durch die NK-Zellen behindert. HERBERMAN und HOLDEN, 1978, schließen aus diesen Beobachtungen, daß NK-Zellen ineffektiv bezüglich der Inhibition des Tumorwachstums größerer Tumoren sind.

Weiterhin ist von möglichem wissenschaftlichem Interesse, daß NK-Zell-Rezeptoren mit dem Immunglobulin G (IgG) reagieren können. Die Rezeptoren lagern dabei die Fc-Fragmente des IgG an, das unter anderem auch für Komplementbindung zuständig ist, wodurch die cytotoxische Aktivität der NK-Zellen vermittelt wird. Die Unterbrechung dieser Verknüpfung NK/IgG (= FcR+) führt zur Auflösung cytotoxischer Aktivität (HERBERMAN et al.,1977; OEHLER et al., 1978).
Das IgG ist jedoch nur in Primärtumoren vorhanden, nicht jedoch in Metastasen oder in mehrfach passagierten Tumoren (im Gegensatz zum IgM), was der beschriebenen und diskutierten Cytotoxizität der NK-Zellen widerspricht (s. hierzu POVLSEN et al., 1973).

Ein weiteres Element der Wirtsabwehr gegen nicht syngenetisches Material stellen die Makrophagen dar. Nach Untersuchungen von ALEXANDER et al., 1973, spielen Makrophagen eine direkte Rolle bei der Verhinderung von Tumorwachstum und Disseminierung von Tumorzellen; EVANS, 1973, geht sogar so weit, daß er in Studien über die in-vitro-Toxizität der Makrophagen Abwehrverhalten gegenüber den Tumoren darlegt, denen die Makrophagen entstammten.

Nach einer (1982) noch unveröffentlichten Beobachtung von HANNA scheinen sich NK-Zellen und Makrophagen in ihrer Kinetik zu unterscheiden. Während 1-3 Tage nach Antigeninjektion (von Corynebacterium parvum) eine NK-Zell-Aktivierung sichtbar wurde, konnten keine Makrophagen entdeckt werden. Makrophagen konnten erst nach 7-14 Tagen nach der Behandlung ausfindig gemacht werden.
FIDLER, 1974, beschreibt nach i.v.-Injektion aktivierter Makrophagen eine Hemmung von pulmonaler Metastasierung bei Melanomen, während sich intraperitoneal injizierte Makrophagen nicht durch dieses Inhibitionsvermögen auszeichnen sollen.

Zusammenfassend läßt sich aussagen, daß die zwei Elemente cytotoxischer Aktivität, NK-Zellen und Makrophagen, eine in Kombination bislang nicht überwundene Hürde auf dem Weg zur Erzielung infiltrativen Wachstums und von Metastasierung von Xenotransplantaten darstellen, die es durch weitergehende Forschung und Nutzung von Alternativen zu überwinden gilt.

4.2.2. Alternative Möglichkeiten zur Erzielung invasiven Wachstums und von Metastasierung

Wie oben dargelegt, scheint eine intraperitoneale Applikation von Xenotransplantaten eher erfolgversprechend zu sein als die subcutane Transplantation, wenn auch bei tierpassagierten humanen Tumoren bisher kaum infiltratives Wachstum oder Aussaat der Tumorzellen zu verzeichnen war.
BASTERT et al., 1981, applizierten Einzelzellsuspensionen eines humanen Ewing-Sarkoms intraperitoneal, wobei sich histomorphologisch keine Abweichung gegenüber herkömmlich transplantierten Tumorfragmenten zeigte.

Bei diesen Versuchen bot sich in der verwendeten Federtusche (" indian ink ", s.o.) ein potentes Mittel zur Elimination von Lymphocyten und Makrophagen aus der Abdominalspülflüssigkeit an, konnte jedoch ebensowenig eine Infiltrations- oder Metastasierungstendenz der injizierten Tumorzellsuspensionen bewirken.

EICHHOLZ et al., 1981, fanden in vergleichenden Versuchsreihen, in denen sie verschiedene Transplantationstechniken anwandten, bei intravenöser Injektion von Tumoreinzelzellsuspensionen in die Schwanzvene von adulten Tieren eine " Metastasierung " von Tumorzellen vornehmlich in die Lungen, die Knochen und in die Muskulatur, während sich in den Abdominalorganen und in den regionären und abdominalen Lymphknoten keine Metastasen nachweisen ließen. " Metastasierung " deswegen, weil es sich hier selbstverständlich nicht um eigentliche Metastasen durch Ausstreuung aus einem bereits vorhandenen Carcinom handelt, sondern um artefizielle Aussaat. Die Versuche zeigen jedoch, daß ein Angehen von Xenotransplantaten grundsätzlich möglich scheint. Dies gibt zu Hoffnungen Anlaß, wenn auch die Forschung hier erst am Anfang steht.

SORDAT et al., 1977, fanden bei neugeborenen Nacktmäusen zahlreiche Disseminationen von Tumorzellen in Versuchen mit Melanomen, Endometriumcarcinomen und colorectalen Carcinomen, die jedoch alle aus Gewebekulturlinien stammten. In unseren Versuchen, in denen wir Mammacarcinome auf 6-8 Wochen alte Nacktmäuse xenotransplantierten, ließ sich keine Metastasierung nachweisen. Selbst bei neugeborenen Nacktmäusen konnte Metastasierung von Tumorzellen aus Mammacarcinomen bisher nur in einem Fall von SHARKEY et al., 1978, nachgewiesen werden.

4.3. Perspektiven

Es gilt, aufbauend auf den bisherigen Erkenntnissen, unter maximal möglicher Verdrängung der makrophagealen und lymphocytären Cytotoxizität - wie oben beschrieben - durch die Erzielung invasiven Wachstums von xenotransplantierten Tumoren und ihrer weitgehend ungehinderten Disseminierung Rückschlüsse auf das Wachstumsverhalten und die eventuell erfolgenden zellulären bzw. geweblichen Veränderungen der Carcinome zu ziehen.
Zur Zeit scheint es durch die der Nacktmaus verbleibenden Abwehrmechanismen gegen Xenotransplantate (NK-Zellen und Makrophagen), d.h. gegen menschliches Tumormaterial, trotz Gabe von Immunsuppressiva und Ganzkörperbestrahlung nicht möglich zu sein, ein reproduzierbares Modell mit metastasierenden Mammacarcinomen zu erzeugen.

5. Zusammenfassung

Die Versuche mit Ganzkörperbestrahlung (7 Gy), mit intraperitonealer Injektion von Federtusche und der Gabe des immunsuppressiv wirksamen Cyclophosphamids an 225 nu/nu-Mäusen hatten zum Ziel, Aufschlüsse zu gewinnen über das Wachstumsverhalten und die Metastasierungsbereitschaft xenotransplantierter humaner Mammacarcinome.

Da sich ein invasives Wachstum der Xenotransplantate n i c h t verifizieren ließ und eine generalisierte Organmetastasierung ausblieb, fand sich in der vorliegenden Arbeit eine Bestätigung für die bei athymen Nacktmäusen vorhandene, antigenspezifische Immunabwehr.
Diese beruht vermutlich auf Zellelementen mit cytotoxischen Eigenschaften wie den NK-Zellen (natural-killer-cells) und den Gewebsmakrophagen, die in ihrer Gesamtheit bisher nicht supprimierbar scheinen und damit umfassenden Erkenntnissen über die Voraussetzungen und Konsequenzen von Carcinomwachstum im Wege stehen.

6. Literaturverzeichnis

ALEXANDER, P., EVANS, R., MIKULSKA, Z.B.:
Relationship between concomitant immunity and metastases - the role of macrophages in concomitant immunity involving the peritoneal cavity, pp.177-185.
In: GARATTINI, S. and FRANCHI, G.(eds): Chemotherapy of cancer dissemination and metastasis.
New York: Raven Press, 1973.

BADER, A., FORTMEYER, H.P., LAPP, S., BASTERT, G.:
Zum Wachstumsverhalten menschlicher Malignome nach Transplantation auf nu/nu-Mäuse. I. Abhängigkeit vom Alter der Empfängertiere.
Zeitschrift Versuchstierkunde 23, 1981.

BASTERT, G.:
In-vitro- und in-vivo-Methoden zur prätherapeutischen Testung menschlicher Tumoren gegenüber antineoplastischen Behandlungsmaßnahmen.
Therapiewoche 27, 7974-7985, 1977.

BASTERT, G.:
Human mammary tumors in athymic rodents.
In: BASTERT, G., FORTMEYER, H.P., SCHMIDT-MATTHIESEN, H. (Hrsg.): Thymus Aplastic Nude Mice and Rats in Clinical Oncology.
G.Fischer-Verlag, Stuttgart, New York, 1981.

BASTERT, G.:
Persönliche Mitteilungen, 1982 und 1983.

BASTERT, G., FORTMEYER, H.P., EICHHOLZ, H., MICHEL, R.T., HUCK, R., SCHMIDT-MATTHIESEN, H.:
Human breast cancer in thymusaplastic nude mice.
In: BASTERT, G., FORTMEYER, H.P., SCHMIDT-MATTHIESEN, H. (Hrsg.): Thymus Aplastic Nude Mice and Rats in Clinical Oncology.
G.Fischer-Verlag, Stuttgart, New York, 1981.

BECKER, S., KLEIN, E.:
Decreased " natural killer " -NK- effect in tumor bearing mice and its relation to the immunity against oncorna virus determined cell surface antigens.
European J. Immunol. 6, 892-898, 1977.

BROCK, N., HOHORST, H.J.:
Metabolism of cyclophosphamide.
Cancer (Philadelphia) 19, 1o3, 1966.

EICHHOLZ, H., BASTERT, G., FORTMEYER, H.P., HUCK, R., MICHEL, R.T., SCHMIDT-MATTHIESEN, H.:
Experiments on the development of metastasizing human mammary carcinomas in nu/nu mice.
In: BASTERT, G., FORTMEYER, H.P., SCHMIDT-MATTHIESEN, H. (Hrsg.): Thymus Aplastic Nude Mice and Rats in Clinical Oncology.
G.Fischer-Verlag, Stuttgart, New York, 1981.

EVANS, R.:
Macrophages and the tumor bearing host.
Br.J.Cancer 28(Suppl.), 19-25, 1973.

FIDLER, I.J.:
Inhibition of pulmonary metastasis by intravenous injection of specifically activated macrophages.
Cancer Res. 34, 1o74-1o78, 1974.

FLANAGAN, S.P.:
" Nude " , a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse.
Genet.Res.Camb. 8, 295, 1966.

FOGH, J., TISO, J., ORFEO, T., FOGH, J.M., DANIELS, W.P., SHARKEY, F.E.:
Analysis of Human Tumor Growth in Nude Mice.
Proceedings of the 3rd international workshop on nude mice.
G.Fischer-Verlag, New York, 1982.

FORTMEYER, H.P.:
Thymusaplastische Maus (nu/nu),thymusaplastische Ratte (rnu/rnu).Haltung, Zucht, Versuchsmodelle.
Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, 1981.

FORTMEYER, H.P., BASTERT, G.:
Breeding and maintenance of nu/nu mice and rnu/rnu rats.
In: BASTERT, G., FORTMEYER, H.P., SCHMIDT-MATTHIESEN, H. (Hrsg.): Thymus Aplastic Nude Mice and Rats in Clinical Oncology.
G.Fischer-Verlag, Stuttgart, New York, 1981.

GIOVANELLA, B.C., YIM, S.O., STEHLIN, J.S., WILLIAMS, L.J.jr.:
Development of invasive tumors in the nude mouse after injection of cultured human melanoma cells.
J.Nat.Cancer Inst. 48, 1531, 1972.

GIOVANELLA, B.C., MORGAN, A.C., STEHLIN, J.S., WILLIAMS, L.J.jr.:
Development of invasive tumors in nude thymusless mice injected with human cells.
Proc.Am.Ass.Cancer Res. 38, 1, 1973.

GIOVANELLA, B.C., STEHLIN, J.S., LEE, S.S., SHEPARD, R., WILLIAMS, L.J.:
Heterotransplantation of human breast carcinomas in "nude" thymus-deficient mice.
Proc.Am.Ass. Cancer Res. 17, 124, 1976.

GIOVANELLA, B.C., FOGH, J.:
Present and future trends in investigations with the nude mouse as a recipient of human tumor transplants.
In: FOGH, J., GIOVANELLA, B.C.: The Nude Mouse in Experimental and Clinical Research.
Academic Press, New York, San Francisco, London, 1978.

GIOVANELLA, B.C., STEHLIN, J.S., FOGH, J., SHARKEY, F.E.:
Serial transplantation of human malignant tumors in nude mice and their use in experimental chemotherapy, pp 163-179. In: HOUCHENS, D.P. and OVEJERA, A.A.(eds): Proceedings of the symposium on the use of athymic (nude) mice in cancer research.
G.Fischer-Verlag, New York, 1978.

HANNA, N.:
Nude mice as recipients for syngeneic, allogeneic and xenogeneic neoplasms.
In: Design of models for testing cancer therapeutic agents.
Eds: FIDLER, I.J., WHITE, R.J.,
Nostrand Reinhold Company, New York, 1982.

HELSON, L., HELSON, C., DAS, S.K., RUBINSTEIN, R.:
Biochemistry and chemotherapy and neutral tumors in nude mice. In: HOUCHENS, D.P. and OVEJERA, A.A.(eds): Proceedings of the symposium on the use of athymic (nude) mice in cancer research.
G.Fischer-Verlag, New York, 1978.

HERBERMAN, R.B., NUNN, M.E., LAVRIN, D.H.:
Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors.
I. Distribution of reactivity and specificity.
Int.J.Cancer 16, 216-229, 1975.

HERBERMAN, R.B., BARTRAM, S., HASKILL, J.S. et al.:
Fc receptors on mouse effector cells mediating natural cytotoxicity against tumor cells.
J.Immunol. 119, 322-326, 1977.

HERBERMAN, R.B., HOLDEN, H.T.:
Natural cell mediated immunity.
Advances Cacer Research, eds. KLEIN, G., WEINHOUSE, S., Vol.27, p. 3o5. Academic Press, New York, 1978.

HERBERMAN, R.B., DJEU, J.Y., KAY, H.D., ORTALDO, J.R., RICCARDI, C., BONNARD, G.D., HOLDEN, H.T., FAGNANI, R., SANTONI, A., PUCCETTI, P.:
Natural killer cells: characteristics and regulation of activity.
Immunol.Review 44, 43-69, 1979.

HERSCH, E.M.:
Modification of Host Defense Mechanisms.
In: HOLLAND, J.F., FREI, E.III(eds): Cancer Medicine, p. 681. Philadelphia: Lea & Febiger, 1973.

ISAACSON, J.H., CATTANACH, B.M.:
Report.
Mouse News Letter 27, 31, 1962.

IKEDA, R.M., GERSHWIN, M.E., SHIFFRINE, M., KAWAKAMI, T.G.:
The kinetics and radiology of heterotransplanted human endometrial carcinoma to nude mice.
In: HOUCHENS, D.P., OVEJERA, A.A.(eds):
Proceedings of the symposium on the use of athymic (nude) mice in cancer research.
G.Fischer-Verlag, New York, 1978.

KAMEYA, T., SHIMOSATO, Y., TUMURAYA, M., OHSAWA, N., NOMURA, T.:
Human gastric choriocarcinoma serially transplanted in nude mice.
J.Natl.Cancer Inst. 56, 325-329, 1976.

KAPLAN, J., CALLEWAERT, D.M.:
Expression of human T-lymphocyte antigens by natural killer cells.
J.Natl. Cancer Inst. 60, 961, 1978.

KEPP, R., STAEMMLER, H.J.:
Lehrbuch der Gynäkologie, 12. Auflage.
G.Thieme-Verlag, Stuttgart, 1977.

KIESSLING, R., HOCHMAN, P.S., HALLER, O. et al.:
Evidence for a similar or common mechanism for natural killer cells activity and resistance to hemopoietic grafts.
European J.Immunol. 7, 655-663, 1977.

KIM, U., HAN, T., GHOSH, S., FREEDMAN, V.H., SHIN, S.I., PRESSMAN, D.:
Immunologic Mechanisms of Selective Graft Resistance to Certain Malignant Tumors and Prevention of Metastases by Athymic Nude Mice.
Proceedings of the 3rd international workshop on nude mice.
G.Fischer-Verlag, New York, 1982.

KYRIAZIS, A.P., DI PERSIO, L., MICHAEL, G.J., PESCE, A.J., STINNETT, J.D.:
Growth Patterns and Metastatic Behaviour of Human Tumors Growing in Athymic Mice.
Cancer Research 38, 3186-319o, 1978.

KYRIAZIS, A.P., DI PERSIO, L., MICHAEL, G.J., PESCE, A.J., STINNETT, J.D.:
Influence of the mouse hepatitis virus (MHV) infection on the growth of human tumors in the athymic mouse.
Int.J.Cancer 23, 4o2-4o9, 1979.

LEONHARDT, H.:
Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen, 4.Auflage.
G.Thieme-Verlag, Stuttgart, 1974.

LIMBURG, H.:
Einführungsvortrag Annual Meeting of the C.T.O.C.(U.I.C.C.) in Homburg/Saar, Mai 1978.

LIMBURG, H., KRAHE, M.:
Über das Verhalten von Tumorzellen des weiblichen Genitales in der Gewebekultur und deren Austestung gegenüber neuen Zytostatika.
Arch.Gynäkol. 2o2, 59, 1964.

LOOR, F., ROELANTS, G.E.:
Immunofluorescence studies of a possible prethymic differentiation in congenitally athymic (nude) mice.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 254, 226, 1975.

MACHADO, E.A., LOZZIO, B.B., LOZZIO, C.B., LAIR, S.V.:
Study of the metastatic process in nude mice.
In: REED, N.D.: Third Intern.Workshop Nude Mice.
G.Fischer-Verlag, Stuttgart, New York, 1981.

MAGUIRE, H.jr., OUTZEN, H.C., CUSTER, R.P., PREHN, R.T.:
Invasion and metastasis of a xenogeneic tumor in nude mice.
J.Natl.Cancer Inst. 57, 439-442, 1976.

MATTHIAS, M.:
Methoden und Anwendungsmöglichkeiten der Organkultur in der klinischen und experimentellen Krebsforschung.
Arch. Geschwulstforschung 41, 382, 1973.

MICHEL, R.T., BASTERT, G., FORTMEYER, H.P., NORD, G., SCHMIDT-MATTHIESEN, H.:
Effect of ablative, additive and antiestrogen (Tamoxifen) treatment on the tumor growth of transplanted breast cancers in nude mice.
Acta endocrinol. 87, Suppl.215, 141, 1978.

MILLER, J.F., DOAK, S.M., CROSS, A.M.:
Role of the thymus in recovery of the immune mechanism in the irradiated adult mouse.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 112, 785, 1963.

MINATO, N., BLOOM, B.E., JONES, C., HOLLAND, J., REID, L.M.:
Mechanism of rejection of virus persistently infected tumor cells by athymic nude mice.
J.Exptl.Med. 149, 1117-1133, 1979.

MIWA, M., HIROHASHI, S., SHIMOSATO, Y., MUKOJIMA, T., OHKURA, H., SAKURA, H., KAWACHI, T., SUGIMURA, T.:
Coproduction of carcinoembryonic antigen and alpha-fetoprotein in transplantable human colon cancer in nude mice.
In: NOMURA, T. et al.(eds): Proc.Sec.Intern.Workshop Nude Mice.
G.Fischer-Verlag, Stuttgart, New York, 1977.

OEHLER, J.R., LINDSAY, L.R., NUNN, M.E. et al.:
Natural cell mediated cytotoxicity in rats. I. Tissue and strain distribution and demonstration of a membrane receptor for the Fc portion of IgG.
Int.J.Cancer 21, 2o4-2o9, 1978.

PANTELOURIS, E.M.:
Absence of the thymus in a mouse mutant.
Nature (London) 217, 37o, 1968.

POVLSEN, C.O.:
Heterotransplantation of human gastrointestinal tumors to nude mice.
In: BASTERT, G., FORTMEYER, H.P., SCHMIDT-MATTHIESEN, H. (Hrsg.): Thymus Aplastic Nude Mice and Rats in Clinical Oncology.
G.Fischer-Verlag, Stuttgart, New York, 1981.

POVLSEN, C.O., RYGAARD, J.:
Heterotransplantation of human adeno-carcinoma of the colon and rectum to the mouse mutant nude. A study of nine consecutive transplantations.
Acta path.microbiol.scand.,sect.A, 79, 159, 1971.

POVLSEN, C.O., FIALKOW, P.J., KLEIN, E., KLEIN, G., RYGAARD, J., WIENER, F.:
Growth and antigeneic properties of a biopsy-derived Burkitt's lymphoma in thymus-less (nude) mice.
Natl.J.Cancer 11, 3o-39, 1973.

RICCARDI, C., FIORETTI, M., GIAMPIETRI, A. et al.:
Growth inhibition of normal or drug-treated lymphoma-cells in lethally irradiated mice.
J.Natl.Cancer Inst. 6o, 1o83-1o9o, 1978.

RYGAARD, J., FRIIS, C.W.:
The husbandry of mice with congenitally absence of the thymus (nude mice).
Zeitschrift Versuchstierkunde 16, 1, 1974.

SHARKEY, F.E., FOGH, J.M., HAJDU, S.I., FITZGERALD, P.J., FOGH, J.:
Experience in surgical pathology with human tumor growth in the nude mouse.
In: FOGH, J., GIOVANELLA, B.C.(eds): The Nude Mouse in Experimental and Clinical Research.
Academic Press, New York, San Francisco, London, 1978.

SHIN, S., REID, L.C., COLBURN, P.C., KADISH, A.S., FLEISCHER, N.:
Development of transplantable functional endocrine tumor lines in nude mice.
In: NOMURA, T. et al.(eds): Proc.Sec.Intern.Workshop Nude Mice.
University of Tokyo Press, Tokio, 1977.

SIGURA, K.:
Methods Animal Expt. 2, pp. 171, 1965.

SIMON, R.S., KLEIN, A.S., KIM, U., FREEDMAN, V.H., SHIN, S.I.:
Thymus-independent host resistance against the growth and metastases of allogeneic and xenogeneic tumors in nude mice.
Proceedings of the 3rd International Workshop on Nude Mice.
G.Fischer-Verlag, New York, 1982.

SORDAT, J.G., FRITSCHE, R., MACH, J.P., CARREL, S., OZZELLO, L., CEROTINI, J.C.:
Morphological and functional evaluation of human solid tumors serially transplanted in nude mice.
In: RYGAARD, J., POVLSEN, C.O.(eds): Proc.First Int.Workshop Nude Mice.
G.Fischer-Verlag, Stuttgart, New York, 1974.

SORDAT, B., MERENDA, C., CARREL, S.:
Invasive growth and dissemination of human solid tumors and malignant cell lines grafted subcutaneously to newborn nude mice.
Proc.Sec.Intern.Workshop Nude Mice, 313-326, 1977.

STEEL, G.G., COURTENAY, V.D., ROSTOM, A.Y.:
Improved Immune-Suppression Techniques for the Xenografting of Human Tumors.
Br.J.Cancer 37, 224, 1978.

TAGUCHI, T., FUJITA, M., USUGANE, M.:
Heterotransplantation of various human and canine tumors in nude mice.
In: NOMURA, T. et al.(eds): Proc.Sec.Intern.Workshop Nude Mice.
G.Fischer-Verlag, Stuttgart, New York, 1977.

TANNENBERGER, S., BACIGALUPO, G.:
Einige Erfahrungen mit der individuellen Behandlung maligner Tumoren nach prätherapeutischer Zytostatika-Sensibilitätsprüfung in vitro (Onkobiogramm).
Arch.Geschwulstforschung 35, 44, 197o.

TORHORST, J., RICHNER, M.:
Growth Enhancement of Human Ewing-Sarcoma in Nude Mice by " Macrophage Blockade ".
In: BASTERT, G. et al.: Thymus Aplastic Nude Mice and Rats in Clinical Oncology.
G.Fischer-Verlag, Stuttgart, New York, 1981.

USADEL, K.H., SCHWEDES, U., MINNE, H., KLEMPA, I., VLACHYANNIS, J., FORTMEYER, H.P., SCHÖPFLING, K.:
Transplantation of human parathyroid adenoma and carcinoma in nude mice.
Acta endocrin.Suppl. 215, 87, 55, 1978.

VISFELDT, J., POVLSEN, C.O., RYGAARD, J.:
Chromosome analyses of human tumors following heterotransplantation to the mouse mutant nude.
Acta path.microbiol.Scand.,Sect.A, 8o, 169, 1972.

WELLHÖNER, H.H.:
Pharmakologie und Toxikologie.
Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin, New York, 1975.

WEST, W.H., BOOZER, R.B., HERBERMAN, R.B.:
Low affinity E-rosette formation by the human K cell.
J.Immunol. 12o, 9o, 1978.

7. Anhang

Im folgenden Überblick sind alle Versuchsreihen der vorliegenden Arbeit, geordnet nach den in 2.5. dargelegten Kollektiven, tabellarisch zusammengefaßt wiedergegeben.

Erläuterungen

1. Die einzelnen in den laminar-air-flow- Regalen stehenden Käfige waren mit unterschiedlich vielen Versuchstieren belegt; die Trennmarkierungen in den nachfolgenden Tabellen erfolgten dementsprechend zur besseren Übersicht.

2. Von den Nacktmäusen, bei denen der Transplantattumor nicht anging resp. regredierte, wurden keine Präparate der asservierten Organe angelegt.

3. Die Kennzeichnung a - e der bezifferten Präparate diente der Zuordnung der gewonnenen Asservate wie folgt:

a	=	entnommene Tumoren
b	=	regionäre Lymphknoten der vorderen Milchleiste
c	=	Lungen
d	=	Lebern
e	=	thorakale Wirbelsäulensegmente

1. VERSUCHSREIHE MIT TUMOR S.(LFD. NRN.1 - 75):I. LFD. NRN. 1 - 15

LFD.NR.	PRÄPARATE-NR.	BEMERKUNGEN	ZUORDNUNG ZUM KOLLEKTIV NACH 2.5.
1	3oo1 / 82 a-e	-	2.5.4.: Vorbehandlung mit je 2,5 mg ENDOXAN^{R} intraperitoneal 4 Tage prae transplantationem, je o,1 ml Federtusche i.p. 1 Tag prae transplantationem.
2	3oo2 / 82 a-e	-	"
3	3oo3 / 82 a-e	-	"
4	3oo4 / 82 a-e	-	"
5	3oo5 / 82 a-e	-	"
6	kein Präparat	exitus in Narkose	"
7	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
8	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
9	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
1o	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
11	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
12	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
13	kein Präparat	exitus durch Pneumonie	"
14	kein Präparat	exitus durch Pneumonie	"
15	kein Präparat	exitus durch Pneumonie	"

1. VERSUCHSREIHE MIT TUMOR S. (LFD. NRN. 1 - 75): II. LFD. NRN. 16 - 3o

LFD.NR.	PRÄPARATE-NR.	BEMERKUNGEN	ZUORDNUNG ZUM KOLLEKTIV NACH 2.5.
16	3oo6 / 82 a-e	-	2.5.2.: Vorbehandlung mit je 5 mg ENDOXAN^{R} intraperitoneal 4 Tage prae transplantationem.
17	3oo7 / 82 a-e	-	"
18	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
19	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
2o	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
21	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
22	kein Präparat	exitus durch Pneumonie	"
23	kein Präparat	exitus durch Pneumonie	"
24	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
25	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
26	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
27	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
28	kein Präparat	exitus durch Pneumonie	"
29	kein Präparat	exitus durch Pneumonie	"
3o	kein Präparat	exitus durch Pneumonie	"

1. VERSUCHSREIHE MIT TUMOR S. (LFD. NRN. 1 - 75):III. LFD.NRN. 31 - 45

LFD.NR.	PRÄPARATE-NR.	BEMERKUNGEN	ZUORDNUNG ZUM KOLLEKTIV NACH 2.5.
31	3oo8 / 82 a-e	-	2.5.3.: Vorbehandlung mit je 2,5 mg ENDOXAN^{R} intraperitoneal 4 Tage prae transplantationem
32	3oo9 / 82 a-e	-	"
33	3o1o / 82 a-e	-	"
34	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
35	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
36	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
37	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
38	kein Präparat	exitus durch Pneumonie	"
39	kein Präparat	exitus durch Pneumonie	"
4o	3o11 / 82 a-e	-	"
41	3o12 / 82 a-e	-	"
42	3o13 / 82 a-e	-	"
43	3o14 / 82 a-e	-	"
44	3o15 / 82 a-e	-	"
45	3o16 / 82 a-e	-	"

1. VERSUCHSREIHE MIT TUMOR S. (LFD.NRN. 1 - 75): IV. LFD.NRN. 46 - 6o

LFD.NR.	PRÄPARATE-NR.	BEMERKUNGEN	ZUORDNUNG ZUM KOLLEKTIV NACH 2.5.
46	3o17 / 82 a-e	-	2.5.5.: Vorbehandlung mit o,1 ml
47	3o18 / 82 a-e	-	" Federtusche intraperitoneal
48	3o19 / 82 a-e	-	" 1 Tag prae transplantationem
49	3o2o / 82 a-e	-	"
5o	3o21 / 82 a-e	-	"
51	3o22 / 82 a-e	-	"
52	3o23 / 82 a-e	-	"
53	kein Präparat	exitus durch Pneumonie	"
54	3o24 / 82 a-e	-	"
55	3o25 / 82 a-e	-	"
56	3o26 / 82 a-e	-	"
57	kein Präparat	exitus durch Pneumonie	"
58	kein Präparat	exitus durch Pneumonie	"
59	kein Präparat	exitus durch Pneumonie	"
6o	kein Präparat	exitus durch Pneumonie	"

1. VERSUCHSREIHE MIT TUMOR S. (LFD.NRN. 1 - 75): V. LFD.NRN. 61 - 75

LFD.NR.	PRÄPARATE-NR.	BEMERKUNGEN	ZUORDNUNG ZUM KOLLEKTIV NACH 2.5.
61	3o27/ 82 a-e	-	2.5.1.: Vorbehandlung mit Ganzkörperbestrahlung, Dosis 7 Gy, 14 Tage prae transplantationem.
62	3o28 / 82 a-e	-	"
63	3o29 / 82 a-e	-	"
64	3o3o / 82 a-e	-	"
65	3o31 / 82 a-e	-	"
66	3o32 / 82 a-e	-	"
67	kein Präparat	exitus durch Pneumonie	"
68	3o33 / 82 a-e	-	"
69	3o34 / 82 a-e	-	"
7o	3o35 / 82 a-e	-	"
71	3o36 / 82 a-e	-	"
72	3o37 / 82 a-e	-	"
73	3o38 / 82 a-e	-	"
74	3o39 / 82 a-e	-	"
75	3o4o / 82 a-e	-	"

2. VERSUCHSREIHE MIT TUMOR B. (LFD.NRN. 76 - 15o) I. LFD.NRN. 76 - 9o

LFD.NR.	PRÄPARATE-NR.	BEMERKUNGEN	ZUORDNUNG ZUM KOLLEKTIV NACH 2.5.
76	3o41 / 82 a-e	-	2.5.1.: Vorbehandlung mit Ganzkörperbestrahlung, Dosis 7 Gy, 14 Tage prae transplantationem.
77	3o42 / 82 a-e	-	"
78	3o43 / 82 a-e	-	"
79	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
8o	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
81	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
82	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
83	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
84	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
85	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
86	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
87	kein Präparat	exitus durch Pneumonie	"
88	kein Präparat	exitus durch Pneumonie	"
89	kein Präparat	exitus durch Pneumonie	"
9o	kein Präparat	exitus durch Pneumonie	"

2. VERSUCHSREIHE MIT TUMOR B.(LFD.NRN. 76 - 15o)II. LFD.NRN. 91 - 1o5

LFD.NR.	PRÄPARATE-NR.	BEMERKUNGEN	ZUORDNUNG ZUM KOLLEKTIV NACH 2.5.
91	3o44 / 82 a-e	-	2.5.5.: Vorbehandlung mit o,1 ml Federtusche intraperitoneal 1 Tag prae transplantationem.
92	3o45 / 82 a-e	-	"
93	kein Präparat	exitus in Narkose	"
94	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
95	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
96	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
97	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
98	kein Präparat	exitus durch Pneumonie	"
99	3o46 / 82 a-e	-	"
1oo	kein Präparat	exitus in Narkose	"
1o1	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
1o2	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
1o3	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
1o4	kein Präparat	exitus durch Pneumonie	"
1o5	kein Präparat	exitus durch Pneumonie	"

2. VERSUCHSREIHE MIT TUMOR B. (LFD.NRN. 76 - 15o) III.LFD.NRN. 1o6 - 12o

LFD.NR.	PRÄPARATE-NR.	BEMERKUNGEN	ZUORDNUNG ZUM KOLLEKTIV NACH 2.5.
1o6	3o47 / 82 a-e	-	2.5.4.: Vorbehandlung mit je 2,5 mg ENDOXAN^{R} intraperitoneal 4 Tage prae transplantationem, je o,1 ml Federtusche i.p. 1 Tag prae transplantationem
1o7	3o48 / 82 a-e	-	"
1o8	3o49 / 82 a-e	-	"
1o9	3o5o / 82 a-e	-	"
11o	3o51 / 82 a-e	-	"
111	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
112	kein Präparat	exitus durch Pneumonie	"
113	kein Präparat	exitus durch Pneumonie	"
114	3o52 / 82 a-e	-	"
115	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
116	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
117	kein Präparat	exitus durch Pneumonie	"
118	kein Präparat	exitus durch Pneumonie	"
119	kein Präparat	exitus durch Pneumonie	"
12o	kein Präparat	exitus durch Pneumonie	"

2. VERSUCHSREIHE MIT TUMOR B. (LFD.NRN. 76 - 15o) IV.LFD.NRN. 121 - 135

LFD.NR.	PRÄPARATE-NR.	BEMERKUNGEN	ZUORDNUNG ZUM KOLLEKTIV NACH 2.5.
121	3o53 / 82 a-e	-	2.5.3.: Vorbehandlung mit je 2,5 mg ENDOXAN^{R} intraperitoneal 4 Tage prae transplantationem.
122	3o54 / 82 a-e	-	"
123	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
124	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
125	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
126	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
127	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
128	kein Präparat	exitus durch Pneumonie	"
129	kein Präparat	exitus durch Pneumonie	"
13o	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
131	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
132	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
133	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
134	kein Präparat	exitus durch Pneumonie	"
135	kein Präparat	exitus durch Pneumonie	"

2. VERSUCHSREIHE MIT TUMOR B. (LFD.NRN. 76 - 15o) V.LFD.NRN. 136 - 15o

LFD.NR.	PRÄPARATE-NR.	BEMERKUNGEN	ZUORDNUNG ZUM KOLLEKTIV NACH 2.5.
136	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	2.5.2.: Vorbehandlung mit je 5 mg ENDOXAN^{R} intraperitoneal 4 Tage prae transplantationem.
137	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
138	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
139	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
14o	kein Präparat	exitus durch Pneumonie	"
141	kein Präparat	exitus durch Pneumonie	"
142	kein Präparat	exitus durch Pneumonie	"
143	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
144	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
145	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
146	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
147	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
148	kein Präparat	exitus durch Pneumonie	"
149	kein Präparat	exitus durch Pneumonie	"
15o	kein Präparat	exitus durch Pneumonie	"

3. VERSUCHSREIHE MIT TUMOR W. (LFD.NRN. 151 - 225) I. LFD.NRN. 151 - 165

LFD.NR.	PRÄPARATE-NR.	BEMERKUNGEN	ZUORDNUNG ZUM KOLLEKTIV NACH 2.5.
151	32o1 / 82 a-e	-	2.5.4.: Vorbehandlung mit je 2,5 mg ENDOXAN^{R} intraperitoneal 4 Tage prae transplantationem, je o,1 ml Federtusche 1 Tag prae transplantationem i.p.
152	32o2 / 82 a-e	-	"
153	32o3 / 82 a-e	-	"
154	32o4 / 82 a-e	-	"
155	kein Präparat	exitus wegen Darmprolaps	"
156	kein Präparat	exitus wegen Darmprolaps	"
157	32o5 / 82 a-e	-	"
158	32o6 / 82 a-e	-	"
159	32o7 / 82 a-e	-	"
16o	32o8 / 82 a-e	-	"
161	32o9 / 82 a-e	-	"
162	321o / 82 a-e	-	"
163	3211 / 82 a-e	-	"
164	3212 / 82 a-e	-	"
165	3213 / 82 a-e	-	"

3. VERSUCHSREIHE MIT TUMOR W. (LFD.NRN. 151 - 225) II. LFD.NRN. 166 - 18o

LFD.NR.	PRÄPARATE-NR.	BEMERKUNGEN	ZUORDNUNG ZUM KOLLEKTIV NACH 2.5.
166	3214 / 82 a-e	-	2.5.5.: Vorbehandlung mit je o,1 ml Federtusche intraperitoneal 1 Tag prae transplantationem.
167	3215 / 82 a-e	-	"
168	3216 / 82 a-e	-	"
169	3217 / 82 a-e	-	"
17o	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
171	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
172	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
173	3218 / 82 a-e	-	"
174	3219 / 82 a-e	-	"
175	322o / 82 a-e	-	"
176	3221 / 82 a-e	-	"
177	3222 / 82 a-e	-	"
178	3223 / 82 a-e	-	"
179	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
18o	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"

3. VERSUCHSREIHE MIT TUMOR W. (LFD.NRN. 151 - 225)III. LFD.NRN. 181 - 195

LFD.NR.	PRÄPARATE-NR.	BEMERKUNGEN	ZUORDNUNG ZUM KOLLEKTIV 2.5.
181	3224 / 82 a-e	-	2.5.3.: Vorbehandlung mit je 2,5 mg ENDOXAN^{R} intraperitoneal 4 Tage prae transplantationem
182	3225 / 82 a-e	-	"
183	3226 / 82 a-e	-	"
184	3227 / 82 a-e	-	"
185	kein Präparat	exitus in Narkose	"
186	kein Präparat	exitus wegen Darmprolaps	"
187	kein Präparat	exitus wegen Darmprolaps	"
188	3228 / 82 a-e	-	"
189	3229 / 82 a-e	-	"
19o	323o / 82 a-e	-	"
191	3231 / 82 a-e	-	"
192	3232 / 82 a-e	-	"
193	3233 / 82 a-e	-	"
194	kein Präparat	exitus wegen Darmprolaps	"
195	kein Präparat	exitus wegen Darmprolaps	"

3. VERSUCHSREIHE MIT TUMOR W. (LFD.NRN. 151 - 225) IV. LFD.NRN. 196 - 21o

LFD.NR.	PRÄPARATE-NR.	BEMERKUNGEN	ZUORDNUNG ZUM KOLLEKTIV NACH 2.5.
196	3234 / 82 a-e	-	2.5.2.: Vorbehandlung mit je 5 mg ENDOXAN^{R} intraperitoneal 4 Tage prae transplantationem.
197	3235 / 82 a-e	-	"
198	3236 / 82 a-e	-	"
199	3237 / 82 a-e	-	"
2oo	kein Präparat	exitus wegen Darmprolaps	"
2o1	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
2o2	3238 / 82 a-e	-	"
2o3	3239 / 82 a-e	-	"
2o4	324o / 82 a-e	-	"
2o5	3241 / 82 a-e	-	"
2o6	3242 / 82 a-e	-	"
2o7	3243 / 82 a-e	-	"
2o8	3244 / 82 a-e	-	"
2o9	3245 / 82 a-e	-	"
21o	3246 / 82 a-e	-	"

3. VERSUCHSREIHE MIT TUMOR W. (LFD.NRN. 151 - 225) V.LFD.NRN. 211 - 225

LFD.NR.	PRÄPARATE-NR.	BEMERKUNGEN	ZUORDNUNG ZUM KOLLEKTIV NACH 2.5.
211	3247 / 82 a-e	-	2.5.1.: Vorbehandlung mit Ganzkörperbestrahlung, Dosis 7 Gy, 14 Tage prae transplantationem.
212	3248 / 82 a-e	-	"
213	3249 / 82 a-e	-	"
214	325o / 82 a-e	-	"
215	3251 / 82 a-e	-	"
216	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
217	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
218	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
219	3252 / 82 a-e	-	"
22o	3253 / 82 a-e	-	"
221	3254 / 82 a-e	-	"
222	3255 / 82 a-e	-	"
223	3256 / 82 a-e	-	"
224	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"
225	kein Präparat	kein Tumor aufzufinden	"

8. Curriculum vitae

Stefan Wenzel
Am Aufstieg 1o
6242 Kronberg/Ts.

3.6.1955	Geburt in Bremerhaven als Sohn des Oberspielleiters Hans Wenzel und seiner Ehefrau Eva Wenzel, geb. Zickerow.
1962-1966	Besuch der Friedrich-Ebert-Schule in Frankfurt/M.
1966-1972	Besuch des humanistischen Lessing-Gymnasiums in Franfurt/M.
1972-1975	Besuch der humanistischen Bischof-Neumann-Schule in Königstein im Taunus
April 1975	Abitur in Königstein im Taunus
Oktober 1975-Oktober 1982	Studium der Humanmedizin an der J.W.Goethe-Universität in Frankfurt/M.
	Prüfungen: Frühjahr 1978 Ärztliche Vorprüfung Frühjahr 198o 1.Abschnitt der Ärztl. Prüfung Herbst 1981 2.Abschnitt der Ärztl. Prüfung Herbst 1982 3.Abschnitt der Ärztl. Prüfung, schriftlicher Teil
19.1o.1982	Mündlicher Teil des Dritten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung im Stadtkrankenhaus in Offenbach/M.
25.1o.1982	Approbation als Arzt
1.12.1982-13.1.1984	Ableistung des Wehrdienstes als Stabsarzt beim Jägerbataillon 521 in Northeim am Harz
seit 16.1.1984	Assistenzarzt an der Städtischen Frauenklinik in Darmstadt
1/82 - 4/84	Erstellung der Dissertation

Stefan Wenzel

9. Danksagung

Folgenden Personen gilt mein besonderer Dank:

Herrn Prof. Dr. med. Gunther BASTERT, Zentrum der Frauenheilkunde und Geburtshilfe der J.W.Goethe- Universität Frankfurt/M., für seine Hilfe und Betreuung bei der Vorbereitung, der Durchführung und Niederschrift der vorliegenden Arbeit durch wertvolle Ratschläge und Weitergabe eigener Erfahrungen.

Herrn Prof. Dr. med. vet. Hans-P. FORTMEYER, Tierversuchsanlage der Universitätskliniken Frankfurt/M., für die Betreuung und Unterstützung während des tierexperimentellen Teiles der Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Histochemischen Labors der Universitäts-Frauenklinik für die Hilfe bei der Erstellung der histologischen Präparate, vor allem aber für die nette Aufnahme und Geduld ob der häufigen Inanspruchnahme ihrer Erfahrungen.
Namentlich möchte ich Frl. Judith BRAUN, Chemielaborantin, für die große Hilfestellung bei der Kastration und operativen Behandlung der Versuchstiere sowie der Vorbereitung der histologischen Auswertung recht herzlich Dank sagen.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Mutter, Eva WENZEL, für die vielen Stunden danken, in denen sie mir bei der Auswertung der zum Großteil englischsprachigen Literatur durch exakte Übersetzungen große Unterstützung zuteil werden ließ.

1o. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

" VERSUCHE ZUR ENTWICKLUNG EINES MODELLS FÜR DIE KLINIKORIENTIERTE GRUNDLAGENFORSCHUNG AN METASTASIERENDEN MAMMACARCINOMEN MIT HILFE VON DREI MENSCHLICHEN, XENOTRANSPLANTIERTEN MAMMACARCINOMEN "

im Zentrum der Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Abteilung für Gynäkologie und Onkologie,
unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Gunther Bastert ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt habe und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- u. ausländischen Medizinischen Fakultät bzw.Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Kronberg im Taunus 26.4.1984

Stefan Lenzel

Dekan: Professor Dr. H.J.Müller
Referent: Professor Dr. G.Bastert
Korreferent: Professor Dr. H.P.Fortmeyer

Tag der mündlichen Prüfung: 2. Juli 1984